

- King R. C., Robinson A. C., Smith R. F. Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. — Growth, 1956, vol. 20, p. 121—157.
- Mandl A. M. The radiosensitivity of germ cells. — Biol. rev., 1964, vol. 39, No 3, p. 288—371.
- Mossige J. Sperm utilization and brood patterns in *Drosophila melanogaster*. — Amer. natur., 1955, vol. 89, No 845, p. 123—127.
- Olsen M. W. Maturation, fertilization and early cleavage in the hen's egg. — J. morphol., 1942, vol. 70, p. 513—533.
- Pinto R. E., Bartley W. The nature of sex-linked differences in glutathione peroxidase activity and aerobic oxidation of glutathione in male and female rat liver. — Biochem. j., 1969, vol. 115, No 3, p. 449—456.
- Purdom S. E., Dyer K. F. Spontaneous mutation rates. DIS, 1966, No 41, p. 86—87.
- Rensing L. Genetische untersuchungen uber den circadianen Rhythmus des Sauerstoffverbrauche von *Drosophila*. — Zool. Anz., 1969, supp. Bd. 32, S. 298—307.
- Rensing L., Brunken W., Hardeland R. On the genetics of a circadian rhythm in *Drosophila*. — Experientia, 1968, vol. 24, No 5, p. 509—510.
- Russel W. L., Bangham J. W., Gower J. S. Comparison between mutations induced in spermatogonial and postspermatogonial stages in the mouse. — Proc. 10 th Intern. Congr. Genet., 1958, vol. 2, p. 245—246.
- Sävthagen R. Relation between X-ray sensitivity and cell stages in males of *Drosophila melanogaster*. — Nature, 1960, vol. 188, No 4748, p. 429—430.
- Tihen J. A. An estimate of the number of cell generations preceding sperm formation in *Drosophila melanogaster*. — Amer. natur., 1946, vol. 80, No 792, p. 389—392.
- de Wilde J. Reproduction. — In: The physiology of insecta. Ed. by M. Rocketein. N. Y. — L., 1964, p. 10—58.

## СРАВНЕНИЕ МУТАБИЛЬНОСТИ ОРГАНЕЛЬНЫХ И ЯДЕРНЫХ ГЕНОВ В РАЗЛИЧНЫЕ ФАЗЫ ВЕГЕТАТИВНОГО ЦИКЛА *CHLAMYDOMONAS REINHARDI*

В. В. Тугаринов, А. В. Столбова, Фам Тхань Хо, К. В. Квитко

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

Открытие Сэджер (Sager, 1954) у одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardi* системы генов, передаваемых всему потомству зиготы только от одного родителя (ОР-гены), и последующее изучение характера их мутабельности и наследования, расщепления в мейозе и митозе, а также характера рекомбинации ОР-генов, привнесенных от обоих родителей (Sager, Ramanis, 1963, 1965; Gillham, 1963, 1965, 1969), позволили утверждать, что ОР-гены связаны с органеллами. Тем не менее, факты, характеризующие эту полуавтономную часть наследственного аппарата в данный момент, как и в момент открытия, не позволяют судить о локализации и физической природе этих детерминантов. Наличие трех типов молекул ДНК ( $\alpha$ -ядерной,  $\beta$ -хлоропластной,  $\gamma$ -ядрышковой), хорошо различающихся в градиенте плотности в силу различного содержания пар Г—Ц и по некоторым другим показателям, позволяет осуществлять анализ относительной роли ядра, пластома и, косвенно, хондриома в процессах дифференциации, мутагенеза и т. д. (Sueoka, 1960; Chiang, Sueoka, 1967a, b; Sager, Ishida, 1963; Leff e. a., 1963). Открытие факта рекомбинации ОР-генов (Sager e. a., 1965) и последующее биохимическое доказательство существования этого процесса (Chiang, 1969) послужило основой для разработки генетического картирования восьми ОР-генов (Sager e. a., 1971). Вопрос локализации этих детерминантов, с точки зрения Сэджер и сотрудников, решается в пользу хлоропласта, который рассматривается ими как наиболее вероятное местоположение ОР-генов (Sager, Ramanis, 1970, 1971). Однако ряд авторов (Schimmer, Arnold, 1970a, b), анализируя ревертирование *sd*-мутантов в *ss*-формы, а также характер

выщепления у чувствительных (ss) к стрептомицину форм вторичных *sd*-мутантов при митотическом делении, постулируют множественность копий *sd*-гена и его митохондриальное происхождение. Данная точка зрения, видимо, вполне правомочна и напоминает аналогичную ситуацию с факторами устойчивости к эритромицину митохондриального происхождения у *Saccharomyces cerevisiae* (Thomas, Wilkie, 1968). Так или иначе, различные точки зрения по поводу возможной локализации ОР-генов отражают отсутствие прямых экспериментальных данных в пользу той или иной генетически значимой цитоплазматической структуры. По-видимому, в дальнейшем гибридологический анализ в комплексе с мутационным анализом, а также с биохимическими и цитологическими исследованиями дадут сведения для решения этого вопроса.

В данной работе нами предлагается модель, позволяющая подойти к решению этой проблемы путем сравнительного анализа мутагенеза на синхронной культуре вегетативных клеток и гамет *Chlamydomonas reinhardtii*. Исходя из факта асинхронности синтеза компонентов ДНК у этого эукариота (рис. 1; Chiang e. a., 1967 а) представлялся возможным анализ характера мутабельности в различные моменты вегетативного цикла. В связи с этим цель первого этапа экспериментов сводилась к следующему: с помощью мутагенов,

способных взаимодействовать с ДНК ядра и сателлитными ДНК в момент репликации, получить, проанализировать и расчленить типы мутаций, детерминированные или цитоплазматической ДНК, или ядром.

Синхронизация культуры осуществлялась нами по методу, предложенному Кэйтсом, Джонсом (Kates, Jones, 1964), в жидкой среде, основанному на смене суточного цикла: 12 ч свет — 12 ч темноты. Выбор моментов для обработки производился на основе литературных данных о временной приуроченности синтеза ДНК (Chiang, Sueoka, 1967). Обработка культуры мутагенами проводилась в момент отсутствия репликации (1 точка — второй час световой фазы), в момент репликации  $\beta$ ,  $\gamma$ -ДНК (2 точка — седьмой час световой фазы) и в момент репликации  $\alpha$ -ДНК (3 точка — пятый час темновой фазы). В качестве мутагенов были использованы нитрозогуанидин (НГ), охарактеризованный Гилкамом (Gillham, 1965) как агент, способный индуцировать ядерные и внеядерные мутации, а также нитрозоэтилмочевина (НЭМ), по данным Белесцкого и сотрудников (Белесцкий, Разорителева, Жданов, 1969), описанная и как внеядерный мутаген применительно к высшим растениям.

Изучалась мутабельность генов, детерминирующих устойчивость к стрептомицину, и группа пигментных мутантов, включающая в себя желтые, салатные и белые формы. По данным Сэджер, группу стрептомицинустойчивых мутантов по фенотипу в гетеротрофных условиях возможно расчленить на ядерные (желтые в темноте на среде со стрептомицином, устойчивые к 100 ед./мл — *sr*-100) и внеядерные (зеленые, устойчивые к 500 ед./мл — *sr*-500). Если это так и если использованные агенты действуют и как внехромосомные мутагены, правомоч-

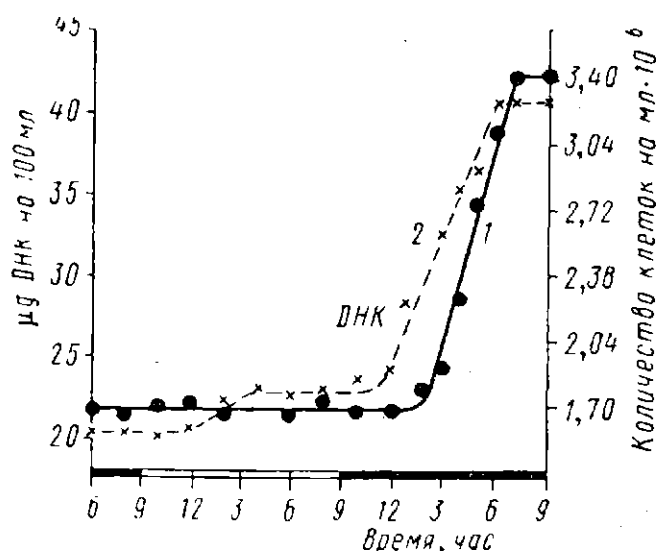


Рис. 1. Асинхронность синтеза сателлитных и ядерной ДНК в синхронной культуре *Chlamydomonas reinhardtii*.

1 — количество клеток на объем культуры; 2 — количество ДНК на объем культуры.

но ожидать появления на средах со стрептомицином «во второй точке» преимущественно зеленый фенотип устойчивых колоний, а в «третьей точке» — преобладание доли желтых устойчивых колоний. Регистрация частоты возникновения пигментных мутантов проводилась суммарно без учета различного характера их детерминации.

Второй этап экспериментов основывался на сравнительных биохимических данных Чанга и Суюэка (Chiang, Sueoka, 1967a) в отношении количественного изменения ДНК в вегетативных клетках и гаметах (таблица).

Свойства компонентов ДНК *Chlamydomonas reinhardtii*  
(по Chiang, Sueoka, 1967)

Стадия развития	Количество ДНК на клетку $\times 10^{-7}$ $\mu\text{g}$	Компоненты ДНК	Плавучая плотность, $\text{г/см}^3$	% Г—Ц	Относительное количество ко всей ДНК, %
Вегетативные клетки	$1,24 \pm 0,08$	$\alpha$	1.723	64.3	85
		$\beta$	1.695	35.7	14
		$\gamma$	1.715	56.1	1
Гаметы . . . . .	$1,23 \pm 0,06$	$\alpha$	1.723	64.3	89
		$\beta$	1.695	35.7	7
		$\gamma$	1.715	56.1	4

Как показали расчеты, общее среднее количество ДНК у вегетативных клеток и гамет примерно одинаково. Однако у последних наблюдаются сдвиги в количестве ДНК: увеличение в ядрышке и падение в хлоропласте. Мы могли предположить, что, если гены, детерминирующие анализируемые признаки, локализованы в митохондриальной ДНК и имеют более полный набор у гамет, то частота мутирования при доминировании стрептомицинрезистентной аллели при прочих равных условиях должна быть значительно выше в сравнении с вегетативными клетками. Если принять, что они локализованы в хлоропласте, мутабельность гамет по данному признаку, по-видимому, должна быть снижена. Таким образом, эта серия экспериментов включала в себя сравнительное изучение мутабельности гамет и несинхронной популяции вегетативных клеток.

В качестве исходного материала служил клон дикого штамма (—) типа спаривания *Chlamydomonas reinhardtii*. Степень синхронизации вегетативной культуры оценивали под микроскопом при трехкратном подсчете количества клеток в течение суток. НЭМ использовалась в дозе 0.075% при 30-минутном воздействии при pH-7, НГ — в дозе 50  $\mu\text{г/мл}$  при 15 минутном воздействии при той же pH. Селективной средой служила плотная (1,5% агара) или полужидкая (0,75% агара) среда L 2 (Столбова, 1971) с добавкой 0.2% ацетата и 50 ед/мл стрептомицина. Контрольный и опытный материал выращивали в гетеротрофных условиях при температуре 25° С.

Индукцию гаметообразования осуществляли выращиванием популяции вегетативных клеток на безазотистой плотной среде в темноте в течение четырех суток. Степень активности гамет проверяли по способности к образованию зигот. В качестве мутагена использовали НЭМ в той же концентрации при 30-минутном воздействии.

Результаты. На синхронной культуре вегетативных клеток наиболее высокий выход мутантов (*sr*) наблюдается в моменты, соответствующие времени синтеза оргanelльных и времени синтеза ядерной

ДНК. Частота мутирования по этим генам во второй и третьей точках повышается относительно первой соответственно на 1,5—2 и 3—3,5 порядка, так же как относительно контроля во всех трех точках. Этот эффект обнаруживается как в случае использования НЭМ, так и в слу-

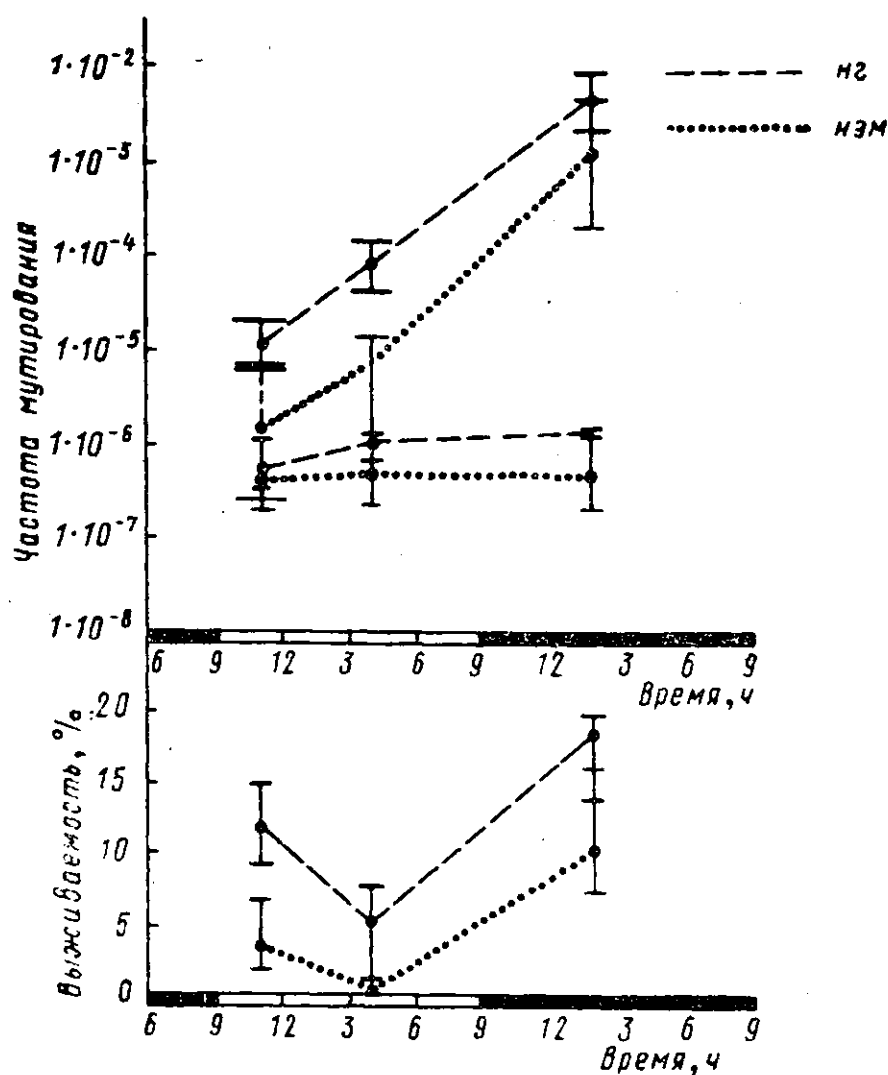


Рис. 2. Зависимость частоты мутирования и выживаемости при воздействии НЭМ и НГ от фазы вегетативного цикла *Chlamydomonas reinhardtii*.

чае НГ (рис. 2). Суммарные данные по соотношению желтых и зеленых фенотипов устойчивых мутантов по точкам в процентах таковы:

НЭМ	1 точка: контроль — 100 ж.; опыт — 3,6 ж., 96,4 зел.
	2 точка: контроль — 100 ж.; опыт — 46,5 ж., 53,5 зел.
	3 точка: контроль — 63,2 ж., 36,8 зел.; опыт — 85,9 ж., 14,1 зел.

Частота возникновения пигментных мутантов в экспериментах с НГ и НЭМ по всем трем точкам остается одной и той же (рис. 3).

Кроме того, существенным является тот факт, что при воздействии НЭМ и НГ в момент синтеза сателлитных ДНК вегетативные клетки обладают наименьшим уровнем выживаемости. Таким образом, как уровень мутабельности, так и способность к выживаемости вегетативных клеток свидетельствуют о различной реакции клеток на мутаген в зависимости от времени воздействия в вегетативном цикле. В экспериментах по сравнительному анализу частоты мутирования вегетативных клеток и гамет показано достоверное увеличение уровня спонтанного и индуцированного мутагенеза у гамет (рис. 3). Одновременно более интенсивный мутагенез гамет сопровождался повышенной чувствительностью к мутагену. Выживаемость в опыте таких клеток на порядок ниже в сравнении с вегетативными клетками. Частота возникновения пигментных мутаций у вегетативных клеток и гамет одинакова (рис. 3).

Часть стрептомицинустойчивых мутантов, выделенных в описанных экспериментах, скрещивали с диким типом для установления способа наследования признака стрептомицинрезистентности. Оказалось, что устойчивость к 100 ед/мл антибиотика (мутанты желтые в темноте на среде со стрептомицином) наследуется двуродительно, что хорошо согласуется с литературными данными. Устойчивость к 500 ед/мл антибиотика (мутанты зеленые в темноте на среде со стрептомицином) наследуется более сложным способом, который изучается в настоящее время.

	Вегетативные клетки	Гаметы
Выживаемость в опыте ( $\bar{X}g\%$ ) ( $11m$ для $P=0,95$ )	29,28 (40,47—22,09)	2,52 (4,29—0,74)
Спонтанный уровень мутирования ( $\bar{X}g$ ) ( $11m$ для $P=0,95$ )	$4,03 \times 10^{-7}$ ( $9,4 \times 10^{-7} - 1,7 \times 10^{-7}$ )	$3,6 \times 10^{-6}$ ( $7,7 \times 10^{-6} - 1,7 \times 10^{-6}$ )
+ НЭМ ( $\bar{X}g$ ) ( $11m$ для $P=0,95$ )	$2,7 \times 10^{-6}$ ( $9,9 \times 10^{-6} - 8,4 \times 10^{-7}$ )	$1,2 \times 10^{-4}$ ( $2,3 \times 10^{-4} - 6,8 \times 10^{-5}$ )
% пигментных мутаций	0,91 ± 0,12	0,92 ± 0,14

Рис. 3. Сравнительная мутабельность гамет и вегетативных клеток *Chlamydomonas reinhardtii*.

**Обсуждение.** Обработка синхронной вегетативной культуры НЭМ и ПГ в моменты, характеризующиеся отсутствием репликации и асинхронной репликации ядерной и сателлитных ДНК, выявила значительное увеличение частот мутирования по *sr*-гену в период репликации всех типов ДНК. Тест на определение уровня устойчивости мутантов обоих типов ДНК действительно вскрыл их генотипическую разноразличность; желтые в темноте, устойчивые формы имеют уровень устойчивости порядка 100 ед/мл, зеленые — около 300—500 ед/мл. Такое подразделение подтверждается способом наследования этих мутантов. Различия в соотношениях индуцированных мутаций типа *sr-1* (ядерных) и *sr-2* (внеядерных) свидетельствует о соответствии времени репликации определенного типа ДНК возникновению определенного фенотипа стрептомицинрезистентной колонии.

Одним из объяснений обнаруженного эффекта, по нашему мнению, может служить изменение генного баланса в различные моменты вегетативного цикла синхронной культуры (Дондуа, Квитко, 1967). Увеличение частоты мутирования связано, по-видимому, с увеличением числа копий (мишеней) данного гена и его состоянием, которое определяет процесс репликации. Если предполагаемая нами закономерность связи мутабельности и генного баланса правомочна применительно к использованным химическим мутагенам, то в таком случае представляется возможность по характеру мутабельности отдельных генов в синхронной культуре судить о характере локализации (ядерной или цитоплазматической) изучаемых детерминантов.

Способ установления последовательности репликации генов в синхронных бактериальных культурах по моменту их чувствительности к

воздействию специфических агентов и возможность их дальнейшего картирования, предложенный Райяном и Цетруло (Ryan, Cetgulo, 1963), в принципе, по-видимому, может быть применим при определенных ситуациях и к эукариотическим системам.

Как указывалось ранее, во второй серии экспериментов был также использован принцип изменения дозы генов на системе вегетативных клеток и гамет. Однако, если предыдущие опыты предполагали установить корреляцию между фенотипом устойчивых мутантов и характером их детерминации (ядро или цитоплазма), то по результатам последующих экспериментов косвенно можно было судить о возможной локализации в пределах цитоплазмы (хлоропласт или митохондрии). Более эффективный спонтанный и индуцированный мутагенез гамет в сравнении с вегетативными клетками свидетельствует, по нашему мнению, о митохондриальной локализации *sr-500* детерминанта. Предлагаемое объяснение является не единственным. Данные биохимических исследований Сирмы и Чанга (Sierma, Chiang, 1971) свидетельствуют о том, что на безазотистой среде каждая вегетативная клетка, делясь единожды на четыре гаметы, претерпевает ряд изменений, главными из которых являются деградация системы всех типов рибосом, прекращение белкового синтеза и деградация рибосомальной РНК. По данным авторов, тот нуклеотидный пул, который освобождается в результате этих процессов дифференциации, утилизируется в момент репликации ДНК. Естественно принять, что репарационные способности клетки в связи с отсутствием белкового синтеза в первый период дедифференциации при воздействии мутагена могут быть снижены. Подтверждением этому может служить высокая чувствительность гамет при воздействии НЭМ в сравнении с вегетативными клетками (см. рис. 3).

Уровень мутабельности пигментных мутаций в обеих сериях экспериментов сходен. Дифференциация этой группы мутантов на различные типы и их специфика распределения в различные моменты вегетативного цикла, а также на стадии гамет является предметом дальнейшего анализа.

### Выводы

1. На синхронной культуре вегетативных клеток *Chlamydomonas reinhardtii* при воздействии НЭМ и НГ наиболее высокий выход мутаций наблюдается в моменты, соответствующие времени синтеза оргanelльных и времени синтеза ядерной ДНК.

2. В момент синтеза сателлитных ДНК вегетативные клетки обладают наименьшим уровнем выживаемости при данных дозах НЭМ и НГ.

3. Показано увеличение мутабельности гамет при сравнении с мутабельностью несинхронной популяции вегетативных клеток. Гаметы обладают более высокой чувствительностью при данных дозах НЭМ.

4. Уровень мутирования вегетативных клеток в момент отсутствия репликации и в момент репликации ДНК (ядерной и цитоплазматической), а также гамет при учете пигментных мутаций одинаков.

Авторы благодарят сотрудников лаборатории генетики и цитогенетики микроорганизмов БНИИ ЛГУ А. С. Чунаева и Т. Н. Борщевскую за помощь в осуществлении этой работы.

### Summary

The highest yield of streptomycin resistant mutants induced by nitrosoethylurea and nitrosoguanidine was observed at the moments corresponding to the DNA synthesis in course of synchronous cycle of vegetatively propagated *Chlamydomonas* cells. The proportion of *sr-1* mutants was higher at the moments of nuclear DNA synthesis, *sr-2*,

organelle type mutants were abundant treatment of cells before and at the moments of organelle DNA synthesis. The cell of gamet have twice as less chloroplast DNA (Chiang a. Sueoka, 1967). It was found that cells in gametic population were 50 times more mutable then vegetative cells. From the point of view of target theory this fact give an indication that mitochondrial DNA is concerned with sr-2 mutation.

## ЛИТЕРАТУРА

- Белецкий Ю. Д., Разорителява Е. К., Жданов Ю. А. Цитоплазматические мутации подсолнечника, индуцированные N-нитрозометил-мочевинной. — ДАН СССР, 1969, т. 186, № 6, с. 1425.
- Дондуа А. К., Квитко К. В. Зависимость генного баланса клеточной популяции от особенностей митотического цикла. I. Математическая модель — «Генетика», 1967, № 8, с. 126—133.
- Столбова А. В. Генетический анализ пигментных мутаций *Chlamydomonas reinhardtii* II. Анализ наследования мутаций бесхлорофильности и светочувствительности в скрещиваниях с диким типом. — «Генетика», 1971, т. VII, № 11, с. 124—129.
- Chiang K. S., Sueoka N. Replication of chromosomal cytoplasmic DNA during mitosis and meiosis in the eucariote *Chlamydomonas reinhardtii*. — J. cell physiol., 1967a, vol. 70. Suppl. I, p. 89.
- Chiang K. S., Sueoka N. Replication of chloroplast DNA in *Chlamydomonas reinhardtii* during vegetative cell cycle: its mode and regulation. — Proc. nat. acad. sci. USA, 1967b, No 57, p. 1506—1513.
- Chiang K. S. Replication, transmission and recombination of cytoplasmic DNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*. — In: Int. Symposium Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplast. Canberra. Australia, 1969.
- Gillham N. W. The nature of exception to the pattern of uniparental inheritance for high-level streptomycin resistance in *Chlamydomonas reinhardtii*. — Genetics, 1963, No 48, p. 431—439.
- Gillham N. W. Linkage and recombination between nonchromosomal mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. — Proc. nat. acad. sci. USA, 1965, No 54, p. 1560—1567.
- Gillham N. W. Uniparental inheritance in *Chlamydomonas reinhardtii*. — Amer. natur., 1969, No 103, p. 932.
- Kates I. R., Jones R. F. The control of gametic differentiation in liquid cultures of *Chlamydomonas*. — Cell. compar. physiol., 1964, No 63, p. 157—164.
- Leff I., Epstein H. T., Schiff I. A. DNA satellites from cells of green and applastidic algae. — Biochem. biophys. res. comm., 1963, No 13, p. 126—130.
- Ryan F. I., Cetrulo S. D. Directed mutation in a synchronized bacterial population. — Biochem. biophys. res. comm., 1963, No 12, (6), p. 445.
- Sager R. Mendelian and non-Mendelian inheritance of streptomycin resistance in *Chlamydomonas*. — Proc. nat. acad. sci. USA, 1954, No 40, p. 356—363.
- Sager R., Ramanis Z. The particulate of nonchromosomal genes in *Chlamydomonas*. — Proc. nat. acad. sci. USA, 1963, No 50, p. 260—264.
- Sager R., Ramanis Z. Recombination of nonchromosomal genes in *Chlamydomonas*. — Proc. nat. acad. sci. USA, 1965, No 53, p. 1053—1060.
- Sager R., Ishida M. R. Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. — Proc. nat. acad. sci. USA, 1963, No 50, p. 725—730.
- Sager R., Ramanis Z. A genetic map of non-Mendelian genes in *Chlamydomonas*. — Proc. nat. acad. sci. USA, 1970, No 65, p. 593—600.
- Sager R., Ramanis Z. Methods of genetic analysis of chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. — In: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts. 1971, North Holland, p. 250—259.
- Schimmer O., Arnold C. O. Untersuchungen über Reversions — und Segregationverhalten eines außerkaryotischen gens von *Chlamydomonas reinhardtii* zur Bestimmung des Erbtragers. — Molec. and gen. genet., 1970a, No 107, p. 281—290.
- Schimmer O., Arnold C. O. Über die Zahl der Kopien eines außerkaryotischen gens bei *Chlamydomonas reinhardtii*. — Molec. and gen. genet., 1970b, No 107, p. 366—371.
- Sierma R. W., Chiang K. S. Conservation and degradation of cytoplasmic ribosomes in *Chlamydomonas*. — J. molec. biol., 1971, No 58, p. 167—185.
- Sueoka N. Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. — Proc. nat. acad. sci. USA, 1960, No 46, p. 83—91.
- Thomas D. Y., Wilkie D. Recombination of mitochondrial drug-resistance factors in *Saccharomyces cerevisiae*. — Biochem. biophys. res. comm., 1968, No 30, p. 4.